

7. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理およびS9 mix非存在下における短時間処理では、最高処理濃度の1.1 mg/mL(10 mM)においても50%を越える細胞増殖抑制作用は認められなかった。S9 mix存在下における短時間処理での50%細胞増殖抑制濃度は、0.062 mg/mLであった(Fig. 1)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理およびS9 mix非存在下の短時間処理では、1.1 mg/mL(10 mM)を最高濃度とし、公比2で3濃度を設定した(0.28, 0.55, 1.1 mg/mL)。S9 mix存在下の短時間処理では50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(0.0075, 0.015, 0.030, 0.060, 0.12 mg/mL)。しかし、連続処理においては、染色体分析の可能な濃度が得られなかったため、1.1 mg/mL(10 mM)を最高濃度として、公比2で10濃度(0.0021~1.1)に設定し直し、再度試験を行った。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、局方注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚のディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

9. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 μ g/mLになるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3 vol%ギムザ溶液で染色した。

10. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20%以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果(Table 1, 2)、連続処理では0.14 mg/mLが、S9 mix非存在下およびS9 mix存在下での短時間処理では1.1 mg/mLおよび0.060 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処

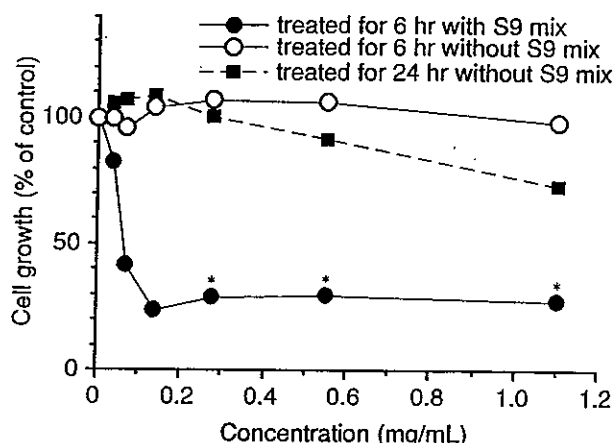


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 3-aminophenol

*: Precipitates or unknown materials remained adhering onto culture dishes

理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会(MMS)¹¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

11. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法²¹⁾により、有意差検定を実施した($p < 0.01$)。また、用量依存性に関してコクラン・アーミテッジの傾向性検定²¹⁾($p < 0.01$)を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。3-アミノフェノールを加えて24時間連続処理したすべての処理群(0.034~0.14 mg/mL)において、染色体の構造異常が誘発され、その頻度は8.0~21.0%(gapを除く)であった。一方、倍数性細胞の誘発作用については、高濃度群(0.14 mg/mL)では毒性のために800細胞の観察できず、観察細胞数は764細胞であったが、すべての処理群において、有意な倍数性細胞の増加は認められなかった。染色体分析ができなかった0.28~1.1 mg/mLの濃度における細胞増殖率は、溶媒対照のレベルであったが、分裂中期細胞が認められなかった(Table 1)ことから、3-アミノフェノールによる強い分裂遅延が生じていたことが示された。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示し

た。3-アミノフェノールを加え、S9 mix非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix存在下で6時間処理した場合は、染色体の構造異常について、傾向性検定($p < 0.01$)において有意差が認められたが、フィッシャーの直接確率法においてはいずれの濃度群でも溶媒対照群との間で有意差($p < 0.01$)が認められず、高濃度(0.06 mg/mL)における出現頻度は6.0%と低頻度であったことから、陰性と判定した。また、すべての処理群において、有意な倍数性細胞の増加は認められなかった。

従って、3-アミノフェノールは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

アミノ基を有するフェノール類のひとつである4-アミノフェノールについても、染色体の構造異常を誘発することが報告されている⁴⁾。4-アミノフェノールは3-アミノフェノールと同様に、24時間処理系列で構造異常を要する細胞の出現頻度が最高(50%)となっており、構造異常の誘発には両物質ともに24時間程度の長い暴露時間を有すると考えられることからCHL/IU細胞に対する作用の類似性が示唆された。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 16-37.
- 2) 吉村功編, “毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ,” サイエンティスト社, 東京, 1987, pp. 76-78.
- 3) 吉村功, 大橋靖夫編, “毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析,” 地人書館, 東京, 1992, pp. 218-223.
- 4) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, 5, 471(1997).

連絡先

試験責任者: 山影康次

試験担当者: 田中憲穂, 日下部博一, 高橋俊孝,
若栗 忍, 橋本恵子

(財)食品薬品安全センター秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Kohji Yamakage (Study director)

Noriho Tanaka, Hirokazu Kusakabe,

Toshitaka Takahashi, Shinobu Wakuri,

Keiko Hashimoto

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center

729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan

Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 3-aminophenol (3AP)^{a)} without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others ^{d)}	No. of cells with aberrations		POL ^{e)} (%)	Trend test ^{f)}		Concurrent cytotoxicity ^{g)} (%)	Mitotic index ^{h)} (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁱ⁾	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Non-treatment			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			—	—
Solvent ^{b)} 0		24	200	1	1	1	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
3AP 0.034		24	200	0	11	7	1	0	0	19	1	16* (8.0)	16* (8.0)	0.00			125.0	—
3AP 0.069		24	200	4	18	18	0	1	0	41	0	31* (15.5)	29* (14.5)	0.13	+	-	131.5	—
3AP 0.14		24	200	4	27	28	3	4	0	66	0	44* (22.0)	42* (21.0)	0.00 ^{j)}			131.0	1.2, 0.6
3AP 0.28 ^{k)}		24	—											—			119.5	0.0, 0.0
3AP 0.55 ^{k)}		24	—											—			109.0	0.0, 0.0
3AP 1.1 ^{k)}		24	—											—			91.0	0.0, 0.0
MC 0.05 µg/mL		24	200	3	44	86	1	3	0	137	1	90* (45.0)	89* (44.5)	0.00			—	—

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, POL: polyploid, MC: mitomycin C.

a) Purity was 99.70 %. b) Distilled water was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. g) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Chromosome analysis was not performed because there was no metaphase due to mitotic inhibition. j) Seven hundred and sixty-four cells were analysed.

*: Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 3-aminophenol (3AP)^{a)} with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others ^{d)}	No. of cells with aberrations		POL ^{e)} (%)	Trend test ^{f)}		Concurrent cytotoxicity ^{g)} (%)	Mitotic index ^{h)} (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁱ⁾	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Non-treatment				200	1	0	0	3	0	0	4	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.00			—	—
Solvent ^{b)} 0		-	6-(18)	200	1	3	2	0	0	0	6	0	5 (2.5)	4 (2.0)	0.13			100.0	—
3AP 0.28		-	6-(18)	200	2	1	5	3	0	0	11	0	5 (2.5)	3 (1.5)	0.00			102.0	—
3AP 0.55		-	6-(18)	200	0	4	21	1	0	0	26	1	9 (4.5)	9 (4.5)	0.00			99.0	—
3AP 1.1		-	6-(18)	200	2	5	12	7	1	10	37	1	12 (6.0)	10 (5.0)	0.00			93.0	6.4, 9.4
MC 0.1 µg/mL		-	6-(18)	200	8	74	200	1	0	0	283	2	138* (69.0)	135* (67.5)	0.13			—	—
Solvent ^{b)} 0		+	6-(18)	200	0	0	1	4	0	0	5	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13			100.0	—
3AP 0.015		+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			103.5	—
3AP 0.030		+	6-(18)	200	0	1	2	0	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00	+	-	89.0	—
3AP 0.060		+	6-(18)	200	7	12	10	0	0	0	29	1	19* (9.5)	12 (6.0)	0.00			50.5	3.2, 4.6
3AP 0.12 ^{k)}		+	6-(18)	—											—			32.5	Tox, Tox
CPA 5 µg/mL		+	6-(18)	200	5	81	253	5	4	20	368	0	149* (74.5)	148* (74.0)	0.00			—	—

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, POL: polyploid, MC: mitomycin C, CPA: cyclophosphamide, Tox: cytotoxic.

a) Purity was 99.70 %. b) Distilled water was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. g) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Chromosome analysis was not performed because there was no metaphase due to cytotoxicity.

*: Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test.

4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールのラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 4-(1-Methyl-1-phenylethyl)phenol in Rats

要約

4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールは界面活性剤原料、各種樹脂改質剤、殺菌殺かび剤、可塑剤、安定剤等の用途で使用されている。オリブ油に溶解した4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールの0, 1500および2000 mg/kgを、1群あたり雌雄各5匹のCrj:CD(SD)IGS系ラットに単回経口投与してその急性毒性を検討し、以下の成績を得た。

死亡は雌雄とも1500および2000 mg/kg投与群いずれにも認められなかった。一般状態では、投与後1あるいは2日まで雌雄の1500および2000 mg/kg投与群で、下痢および肛門周囲の被毛の汚れがみられ、雌では外尿道口周囲の被毛の汚れもみられた。体重では、1500 mg/kg以上の投与群の雄で投与後1~5日、雌で投与後1日に低値がみられたが、その後は順調な体重増加が認められた。剖検では、全例異常は認められなかった。LD₅₀値は、雌雄とも2000 mg/kg以上と推定された。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノール(純度: 99.88%, Lot No. 101002, サンテクノケミカル(株), 東京)は、白色結晶あるいはフレーク状の固体である。入手後の被験物質は遮光気密容器に入れ、5~10℃の冷暗所で保存し、残余被験物質を製造業者が分析し、投与期間中の被験物質の安定性を確認した。媒体はオリブ油(ヤクハン製薬(株))を用い、これに被験物質を所定の濃度となるように溶解させた。調製液は、室温で3時間安定であることから、調製後直ちに遮光気密容器に入れて室温で保存して使用した。また、これらの調製液について濃度を確認し、設定値の±5%以内にあることを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より受け入れた4週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS)の雌雄を8日間の検疫・馴化を行った後、雌雄各15匹を選択して5週齢で試験に供した。投与日の体重は雄が127~139 g、雌が96~108 gであった。動物は、温度21~23℃、湿度46~64%、換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(8時から20時まで点灯)に制御されたバリアシシステムの飼育室で、ブラケット式金属製金網床ケージに群分け

前は1ケージあたり3あるいは5匹を収容し、群分け後は個別飼育した。飼料は、γ線照射固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて、飲料水は札幌市水道水を自動給水装置を用いてそれぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与量設定試験では雌雄のラットに4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールの250, 500, 1000, 1500および2000 mg/kgの5用量を1群3匹に投与した。雌雄とも2000 mg/kg投与群で各1/3例が投与後2日に死亡し、消化管の赤色化等の異常も認められた。このことから、本試験の投与量は雌雄とも予備試験の最大耐量である1500 mg/kgと、限界用量である2000 mg/kgを設定し、これにオリブ油を投与する対照群を含めた雌雄各3群を設定した。1群の動物数は雌雄とも5匹とし、投与前日の体重に基づいて層化無作為抽出法により群分けを行った。

動物は、投与前に16~17時間絶食させ、投与日の体重に基づいて10 mL/kgの容量でラット用胃ゾンデを用いて強制的に胃内に単回投与した。なお、給餌の再開は投与後4時間に行った。

4. 検査項目

1) 一般状態観察

投与後6時間までは頻繁に、その後は投与後14日の剖検日まで1日1回観察した。

2) 体重測定

投与日の投与前、投与後1, 3, 5, 7, 10および14日に測定した。得られた体重から、体重増加量[(投与後14日体重)-(投与日体重)]および体重増加率[(体重増加量)/(投与日体重)×100]を算出した。

3) 剖検

投与後14日に体外表を観察した後、エーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。

5. 統計解析

体重、体重増加量および体重増加率について、Bartlettの検定法によって等分散性を解析し、等分散の場合は、一元配置分散分析法で解析し、有意差がみられた場合は、Dunnettの検定法により解析した。不等分散

の場合は、Kruskal-Wallis法で解析し、有意差がみられた場合は、Mann-WhitneyのU-検定法を用いて解析した。これら対照群と被験物質投与群との間の検定においては、いずれも有意水準を5%とした。

結果

1. 死亡状況およびLD₅₀値

投与後の14日間に、1500および2000 mg/kg投与群の雌雄いずれにも死亡例は認められず、LD₅₀値は雌雄とも2000 mg/kg以上と推定された。

2. 一般状態

雌雄の1500 mg/kg以上の投与群で、下痢、肛門および外尿道口周囲の汚れが投与後30分あるいは1時間から発現し、投与後2日まで継続する例もあったが、投与後3日以降投与後14日まで変化は認められなかった。

3. 体重

雄では投与後1日に1500 mg/kg以上の投与群で低値がみられ、投与後5日まで継続したが、雌では投与後1日に低値または低値傾向がみられたのみで、投与3日から投与後14日まで対照群と差はなく、順調な体重増加を示した。

4. 剖検

雌雄とも各投与群に異常は認められなかった。

考察

1500および2000 mg/kg投与群の雌雄ともに下痢、肛門および外尿道口周囲の汚れがみられたが、死亡例は認められなかった。

体重では、1500および2000 mg/kg投与群の雄で投与後1~5日に、雌で投与後1日に有意な低値がみられたが、投与後7日以降は雌雄とも順調な体重増加を示した。この体重の低値は下痢の消失とともに回復したことから、下痢の影響と推察された。

剖検でも、各投与群の全例で異常は認められなかった。

以上のことから、4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールのラットにおける単回経口投与では、1500 mg/kg以上の投与で下痢および体重増加抑制がみられたが、投与後14日間に重篤な毒性症状は認められず、死亡例もなかった。したがって、本試験条件下でのLD₅₀値は雌雄とも2000 mg/kg以上と推定された。

連絡先

試験責任者：須永昌男

試験担当者：咲間正志、山本美代子、木口雅夫、古川正敏

(株)化合物安全性研究所

〒004-0839 札幌市清田区真栄363番24

Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

Correspondence

Authors: Masao Sunaga (Study director)

Masashi Sakuma, Miyoko Yamamoto,

Masao Kiguchi, Masatoshi Furukawa

Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd.

363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido, 004-0839, Japan

Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールのラットを用いる 28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 4-(1-Methyl-1-phenylethyl)phenol in Rats

要約

4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールは界面活性剤原料、各種樹脂改質剤、殺菌殺かび剤、可塑剤、安定剤等の用途で使用されている。オリブ油に溶解した4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールの0, 100, 300および1000 mg/kgを、1群あたり雌雄各7あるいは14匹のCrj:CD(SD)IGS系ラットに28日間反復経口投与してその毒性と、また0および1000 mg/kg投与終了後の14日間の回復性も併せて検討した。その結果、以下の成績を得た。

一般状態では、雌雄の1000 mg/kg群で投与期間中に軟便が散見され、投与26日に雄2例、雌1例が死亡した。また、投与28日には雄1例を衰弱のため切迫屠殺した。1000 mg/kg群の雄で低体重が投与7日から継続して認められたが、雌では投与期間中に体重の変化はなかった。摂餌量では、雌雄の300 mg/kg以上の群で一過性の低値がみられた。尿検査では、雌雄の300 mg/kg以上の群で沈渣中に大小不同の黒色物質が散見され、飲水量および尿量の増加もみられた。雌の300 mg/kg群および雌雄の1000 mg/kg群で尿比重の低下および尿蛋白の減少がみられ、1000 mg/kg群では、雄で尿pHの低下、雌で尿中ナトリウムの低値も認められた。血液学検査では、1000 mg/kg群の雌雄で血小板数の高値がみられ、雄で白血球数の高値が認められた。血液生化学検査では、1000 mg/kg群の雌雄でGPT、アルカリホスファターゼ、 γ -GTP、無機リンに高値、トリグリセリド、尿素窒素、クレアチニンに高値または高値傾向がみられ、雄でグルコース、カリウムおよびクロールに低値、総蛋白、総ビリルビン、総コレステロールおよびカルシウムに高値、雌でA/G比に低値および蛋白分画の変化が認められた。器官重量では、1000 mg/kg群の雌雄で肝臓および腎臓の絶対重量および相対重量に高値が認められた。300 mg/kg群でも雄の肝臓の相対重量の高値が認められた。回復期間終了時には、1000 mg/kg群の雄で副腎の絶対重量および相対重量の高値が認められた。剖検では、1000 mg/kg群の雌雄で前胃粘膜の肥厚あるいは微細隆起部がみられ、病理組織学的には扁平上皮過形成がみられた。腎臓には白色斑あるいは褪色がみられ、病理組織学的には尿細管の拡張、顆粒円柱、尿細管上皮および集合管上皮の再生等が認められた。また、肝臓には肉眼的には変化がみられなかったが、病理組織学的には胆管増殖が認められた。

これらの投与期間中にみられた変化には、いずれも回

復性が認められた。

以上のことから、300 mg/kg以上の群で、肝臓、腎臓および胃に毒性が認められ、本試験条件下における4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノールの無影響量(NOEL)は雌雄とも100 mg/kg/dayと考えられた。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

4-(1-メチル-1-フェニルエチル)フェノール(純度: 99.88 %, Lot No. 101002, サンテクノケミカル(株), 東京)は、白色結晶あるいはフレーク状の固体である。入手後の被験物質は遮光気密容器に入れ、5~10 °Cの冷暗所で保存し、残余被験物質を製造業者が分析し、投与期間中の被験物質の安定性を確認した。媒体はオリブ油(ヤクハン製薬(株))を用い、これに被験物質を所定の濃度となるように溶解させた。調製液は、遮光・冷蔵保存条件下で8日間安定であることから、調製後速やかに遮光気密容器に入れ、使用時まで冷蔵保存し、室温に戻してから投与に使用した。また、これらの調製液について濃度を確認し、設定値の $\pm 5\%$ 以内にあることを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より受け入れた4週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS)の雌雄を6または7日間の検疫・馴化を行った後、雌雄各42匹を選択して5週齢で試験に供した。投与開始日の体重は雄が137~158 g、雌が123~145 gであった。動物は、温度21~23 °C、湿度52~65 %, 換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(8時から20時まで点灯)に制御されたバリアシステムの飼育室で、ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は1ケージあたり4または5匹を収容し、群分け後は個別飼育した。飼料は、 γ 線照射固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて、飲料水は札幌市水道水を自動給水装置を用いてそれぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与量設定試験では雌雄のラットに0(オリブ油)、250, 500および1000 mg/kgの4用量を1群5匹に投与した。1000 mg/kg群では、雌雄の全例で軟便が散見され、また雌雄ともに摂餌量の低値がみられ、雄では体重増加抑制も認められた。さらに雌雄ともに白血球数の増加傾

向、総コレステロールの高値傾向が、雄に尿素窒素、総蛋白およびGPTの高値、クロールの低値、クレアチニンの高値傾向、雌にトリグリセリドの高値が認められた。病理検査では、雌雄ともに前胃粘膜の微細隆起部がみられ、病理組織学的には粘膜の扁平上皮過形成が認められた。腎臓には白色斑がみられ、病理組織学的には尿細管腔内に細胞残屑、顆粒円柱、尿細管の拡張、尿細管上皮の再生等が認められた。また雄では盲腸の拡張も認められた。器官重量では雌雄の肝臓重量の高値がみられ、雄では腎臓および副腎に相対重量の高値も認められた。

500 mg/kg群では、雌雄の数例で軟便が認められ、摂餌量の低値が雄でみられた。また雌雄ともに白血球数の増加傾向がみられ、雌に総コレステロールの高値および尿素窒素の高値傾向が認められた。病理検査では、雄で肝臓の相対重量が高値であった。

250 mg/kg群では、雌の1例で軟便が認められ、雌に白血球数の増加傾向もみられた。

以上のことから、高用量群には1000 mg/kgを設定し、以下公比約3で除して、中用量群には300 mg/kgを、低用量群には100 mg/kgを、さらに、溶媒のみを投与する対照群も加え、雌雄各4群を設定した。1群の動物数は雌雄とも7匹とし、対照群および1000 mg/kg群には、さらに14日間の回復群として2群を割り付け、投与前々日の体重に基づいて層化無作為抽出法により群分けを行った。

各個体の投与量は投与日に最も近い測定日の体重に基づき、5 mL/kgの容量でラット用胃ゾンデを用いて強制的に胃内に投与した。

4. 検査項目

1) 一般状態観察

投与期間および回復期間中、全例について1日1回以上の頻度で観察した。

2) 体重および摂餌量測定

体重は全例について、投与1日(投与前)、投与2, 7, 14, 21および28日(投与終了日)、回復1, 7および14日ならびに剖検日に測定し、投与1日から28日、回復1日から14日の体重増加量および体重増加率を算出した。また、摂餌量は剖検日を除いて体重と同じ日に測定した。

3) 尿検査および飲水量測定

投与4週および回復2週に全例を代謝ケージに収容して非絶食下で採尿を行い、同時に採尿中の飲水量(重量)も測定した。約3時間の蓄尿についてpH、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血反応(以上、マルティスティックス、バイエル・三共)および色調(肉眼観察)ならびに沈渣(鏡検)を検査し、21時間の蓄尿について尿量(容量)、比重(屈折計法、アタゴ)、ナトリウム、カリウム(以上、炎光光度法)、クロール(電量滴定法)を測定した。

4) 血液学検査

全例について剖検時に16~20時間絶食させた後、エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、EDTA・2Kで処理した血液を用いて赤血球数、ヘマトクリット値、血小板数、白血球数(以上、電気抵抗法)、ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)、平均赤血球容積(赤血球数、ヘマトクリット値より算出)、平均赤血球ヘモグロビン量(赤血球数、ヘモグロビン量より算出)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(ヘマトクリット値、ヘモグロビン量より算出)(以上、自動血球計数装置F-820、シスメックス)、網赤血球数(Brecher法)および白血球百分比(May-Grünwald-Giemsa染色)を測定した。また、3.8%クエン酸ナトリウムで処理した後、3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いて、プロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上、血液凝固自動測定装置アメルングKC-10A、バクスター)を測定した。

5) 血液生化学検査

血液学検査と同時に、全例について腹部大動脈より採血し、ヘパリン処理した後、3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いてGOT(IFCC法)、乳酸脱水素酵素(Wróblewski & La Due法)およびグルコース(ヘキソキナーゼ法)を測定し、無処理血液を3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血清を用いてGPT(IFCC法)、アルカリホスファターゼ(Bessey-Lowry法)、γ-GTP(包接L-γ-グルタミル-p-ニトロアニリド基質法)、総コレステロール(酵素法)、トリグリセリド(遊離グリセロール消去法)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、尿素窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法)、クレアチニン(Jaffé法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(Fiske-SubbaRow法)、総蛋白(ビウレット法)(以上、自動分析装置7150形、日立製作所)、ナトリウム、カリウム(以上、炎光光度法、自動炎光光度計480型、コーニング)、クロール(電量滴定法、クロライドカウンターCL-6M、平沼産業)、蛋白分画およびA/G比(以上、セルロースアセテート膜電気泳動法、全自動電気泳動装置CTE-150、常光)を測定した。

6) 剖検および器官重量測定

投与28日および回復14日の翌日に全例について、体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後放血致死させ剖検した。また、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、下垂体、胸腺、甲状腺(上皮小体含む)、精巣、精巣上体および卵巣の重量を測定するとともに、絶対重量を剖検当日の体重で除し100を乗じて相対重量を算出した。

7) 病理組織学検査

全例について脳(大脳および小脳)、下垂体、胸腺、甲状腺、上皮小体、副腎、脾臓、心臓、胸部大動脈、舌、食道、胃(前胃および腺胃)、肝臓、脾臓、十二指腸、空腸、回腸(バイエル板含む)、盲腸、結腸、直腸、喉頭、気管、肺(気管支含む)、腎臓、膀胱、前立腺、精囊(凝

固腺含む)、卵巣、子宮(角部および頸部)、膈、乳腺(原則として右腹部、雌のみ)、皮膚(腹部)、胸骨(骨髓含む)、大腿骨(骨髓含む)、脊髄(頸部)、骨格筋(大腿部)、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、坐骨神経、眼球、ハーダー腺、精巣および精巣上体を常法に従ってパラフィン包埋後、薄切してヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して対照群および高用量群について鏡検し、前胃、肝臓および腎臓については全例鏡検した。なお、1000 mg/kg群の雄1例の腺胃および直腸については鉍質沈着が認められたため、コッサ染色を施して確認を行った。

5. 統計解析

体重、体重増加量および増加率、摂餌量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液生化学検査、器官の絶対重量および相対重量の成績について、Bartlettの検定法によって等分散性を解析し、等分散の場合は、一元配置分散分析法で解析し、有意差がみられた場合は、Dunnettの検定法により解析した。不等分散の場合は、Kruskal-Wallis法で解析し、有意差がみられた場合は、Mann-WhitneyのU-検定法を用いて解析した。

尿比重および尿検査の定性的項目の成績については、Kruskal-Wallisの検定法で解析し、有意差がみられた場合はMann-WhitneyのU-検定法を用いて解析した。

これら対照群と被験物質投与群との間の検定においては、いずれも有意水準を5%とした。

結果

1. 一般状態

投与26日に1000 mg/kg群の雄2例、雌1例が死亡した。また、投与28日に雄1例で投与後約2時間に自発運動の減少および血尿がみられた。同例は体重が減少し摂餌もないため、切迫屠殺を行った。他の例では雌雄の1000 mg/kg群で軟便が投与2日以降に認められ、肛門周囲の被毛の汚れも認められた。また、雌では外尿道口周囲の被毛の汚れも散見されたが、その他には異常は認められなかった。回復期間中には雌雄とも異常は認められなかった。

2. 体重(Fig. 1)

雄の1000 mg/kg群で、投与7日以降に体重増加抑制がみられた。死亡した2例の体重は著明に減少し、切迫屠殺例でも中等度の減少が認められた。一方、雌では群間に有意差は認められなかったが、死亡例では顕著な体重減少が認められた。回復期間中の体重増加量および増加率が、雄で有意な高値、雌で有意な低値であった。

3. 摂餌量(Fig. 2)

雌雄の300 mg/kg以上の群で、投与2日に低値がみられ、1000 mg/kg群の雄では投与21日にも低値が認められた。雄の切迫屠殺例では投与28日に摂餌がなかった。その他の測定日に対照群と比較して有意な高値もみられ

たが、一貫性のある変化ではなく、被験物質との関連は無いと判断した。また回復期間中には雌雄とも変化はなかった。

4. 尿検査および飲水量(Table 1, 2)

投与4週の検査で、雌雄の300 mg/kg以上の群で沈渣中に大小不同の黒色物質が散見された。雌の300 mg/kg以上の群および雄の1000 mg/kg群で、飲水量および尿量の増加、比重および蛋白陽性例の減少が認められ、雄の300 mg/kg群でも飲水量の増加が認められた。雄の1000 mg/kg群ではpHの低下が認められた。回復2週の検査でも、雌雄の1000 mg/kg群に飲水量の増加がみられ、雄では尿量も増加し、カリウムおよびクロール排泄量の高値、雌で比重の低下が認められた。

5. 血液学検査(Table 3, 4)

投与期間終了時に、雌雄の1000 mg/kg群で血小板数の高値が認められ、雄では白血球数も高値を示した。雌では活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。雌の300および1000 mg/kg群で、プロトロンビン時間の短縮が認められたが、用量依存的な変化ではなく、臨床的意義に乏しいことから、毒性学的意義はないと判断した。回復期間終了時に、雄の1000 mg/kg群では、分葉核好中球比率の高値およびリンパ球比率の低値が認められた。

6. 血液生化学検査(Table 5, 6)

投与期間終了時に、雌雄の1000 mg/kg群で、GPT、アルカリホスファターゼ、 γ -GTPおよび無機リンの高値、トリグリセリド、尿素窒素およびクレアチニンの高値あるいは高値傾向が認められた。雄ではグルコース、カリウムおよびクロールの低値、総蛋白、総ビリルビン、総コレステロールおよびカルシウムの高値、雌ではA/G比およびAlbumin分画比の低値、 α_1 、 α_2 および β -globulin分画比の高値も認められた。また雄の100および300 mg/kg群で β -globulin分画比の高値、雌の100 mg/kg群で尿素窒素の低値がみられたが用量依存的な変化ではなかった。回復期間終了時に雌雄の1000 mg/kg群で、総蛋白の低値がみられ、雄ではAlbumin分画比および無機リンの高値、乳酸脱水素酵素の低値、雌ではカリウムの高値が認められた。

7. 剖検

1000 mg/kg群の死亡例では、雄1例で前胃粘膜に多巣性の微細隆起部がみられ、胃、十二指腸および空腸に拡張、腎臓に多巣性の白色斑が認められた。もう1例でも、十二指腸および空腸に拡張が認められた。雌1例では胃、十二指腸および空腸に拡張がみられ、脾臓に萎縮が認められた。1000 mg/kg群の切迫屠殺例の雄1例では、腎臓に褪色および腫大がみられ、膀胱に赤色尿貯留が認められた。

投与期間終了時の生存例では、雌の300 mg/kg群の1例で盲腸に拡張が認められた。雌雄の1000 mg/kg群で